

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Januar 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/02647 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C08F 2/24,  
G01N 33/545, C08F 2/44, C07B 57/00, B01D 69/12

(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse  
6A, 70469 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07525

(22) Internationales Anmeldedatum:  
2. Juli 2001 (02.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 31 859.2 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-  
nahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT  
ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54,  
D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TOVAR, Günter  
[DE/DE]; Oberer Grundweg 25, D-70563 Stuttgart (DE).  
VAIHINGER, Dorothea [DE/DE]; Obere Waiblinger  
Strasse 117, D-70384 Stutthgart (DE). KRÄUTER, Iris  
[DE/DE]; Berliner Strasse 81, D-76185 Karlsruhe (DE).  
WEBER, Achim [DE/DE]; Bachstrasse 40, D-73776  
Altbach (DE). BRUNNER, Herwig [AT/DE]; An der  
Betteleiche 6, D-70569 Stuttgart (DE). HEROLD, Marc  
[DE/DE]; Möhringer Landstrasse 15, D-70563 Stuttgart  
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/02647 A1

(54) Title: IMPROVED MICROGELS AND FILMS

(54) Bezeichnung: VERBESSERTE MIKROGELE UND FILME

(57) Abstract: The invention relates to nanoparticles comprising molecule-specific identification points, to a method for the pro-  
duction thereof and to the use of the same.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisende Nanopartikel so-  
wie Verfahren zu deren Herstel lung und Verwendung.

## Verbesserte Mikrogele und Filme

### Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft verbesserte Mikrogele und daraus hergestellte Filme und Membranen sowie Verfahren zur Herstellung der Mikrogele, Filme und Membranen. Die erfindungsgemäßen Mikrogele, Filme und Membranen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Bereiche, zum Beispiel gebildet durch  
10 kovalent gebundene funktionelle Gruppen oder Kavitäten, zur molekülspezifischen Erkennung tragen. Die erfindungsgemäßen Mikrogele, Filme und Membranen können für chemo- oder/und biospezifische Prozesse der Separation, Sensorik, Analytik, Katalyse,  
15 Stoffproduktion, Medizintechnik oder ähnlichem eingesetzt werden.

Die Emulsionspolymerisation ist ein Spezialverfahren der Polymerisation, bei dem wasserunlösliche  
20 Monomere mit Hilfe von Emulgatoren in Wasser emulgiert und unter Verwendung wasserlöslicher Initiatoren, zum Beispiel Kaliumpersulfat, polymerisiert werden. Die bei der Emulsionspolymerisation anfallenden Polymerdispersionen, zum Beispiel Latex-  
25 Dispersionen, können für eine Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden. Die US 4,521,317 und US 4,021,364 zeigen Möglichkeiten und Grenzen der Emulsionspolymerisation auf.

Im Rahmen von Emulsionspolymerisationen können  
30 grundsätzlich zwei Typen von Emulsionen eingesetzt werden: die Öl-in-Wasser-Emulsion und die Wasser in

-2-

Öl-Emulsion, auch inverse Emulsion genannt. In beiden Fällen wird ein im Reaktionsmedium unlösliches Monomer unter Rühren mittels Emulgatorzugabe dispergiert und die Reaktion durch Zugabe eines Initiators gestartet.

Die Emulsionspolymerisation lässt sich in drei Untertypen einteilen, deren Unterschiede hauptsächlich in der Größe der entstehenden Partikel bestehen: die Makroemulsion: Teilchengröße > 100 nm, die Miniemulsion: Teilchengröße 5 - 500 nm und die Mikroemulsion: Teilchengröße 5 - 50 nm.

Die Herstellung von Biomosaikpolymeren in Form von Membranen, Filmen oder Partikeln mittels Emulsionspolymerisation wird in der EP-A 430 517 beschrieben. Die Polymerisation erfolgt im Wesentlichen in Gegenwart einer oberflächenaktiven Substanz (ionisches oder nicht ionisches Tensid) sowie einer biologisch aktiven Komponente (zum Beispiel Nucleinsäuren), die irreversibel in den Polymergrundkörper eingebaut beziehungsweise an dessen Oberfläche gebunden wird.

Ein Verfahren zur Herstellung biologisch aktiver polymerer Nanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate ist in der WO 98/17317 beschrieben. Weitere Druckschriften, die den Stand der Technik sowie Möglichkeiten und Grenzen biofunktioneller Nanopartikel darstellen, sind die WO 96/20698 und die WO 96/05810.

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese Oberflächenmodifizierter polymerer Nanopartikel stellt die E-

-3-

mulSIONSPolymerisation unter Einsatz von Surfmern dar. Surfmere sind amphiphile Monomere (Surfmer = Surfactant + Monomer), die auf der Oberfläche von Latexpartikeln einpolymerisiert werden können und  
5 diese stabilisieren. Reaktive Surfmere verfügen zusätzlich über funktionalisierbare Endgruppen, die unter milden Bedingungen mit Nucleophilen, wie primären Aminen (Aminosäuren, Peptiden, Proteinen), Thiolen oder Alkoholen umgesetzt werden können. Auf  
10 diese Weise ist eine Vielzahl biologisch aktiver polymerer Nanopartikel zugänglich. Druckschriften, die den Stand der Technik sowie Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung von Surfmern wiedergeben, sind US 5,177,165, US 5,525,691, US 5,162,475,  
15 US 5,827,927, JP 10 018 092 und JP 4 018 929. Arbeiten zur Synthese von Surfmern mit reaktiven Endgruppen wurden unter anderem von Nagai et al. (Polymer 1996, 37(1), 1257-1266; Journal of Colloid and Interface Science 1995, 172, 63-70), Asua et al. (J. Applied Polym. Sci. 1997, 66, 1803-1820)  
20 und Guyot et al. (Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 1996, 1(5), 580-586) veröffentlicht. Die Möglichkeit, funktionelle Surfmer-stabilisierte Latices zur Herstellung kohärenter Latexfilme einzusetzen, ist in den Schriften von Asua ausführlich diskutiert. Partikuläre Filme dieser Latices wurden in  
25 der Literatur noch nicht beschrieben.

Molekular geprägte Polymerfilme können gemäß der JP 11315150 durch ein neuartiges Gießverfahren hergestellt werden. Dabei wird eine wässrige Lösung aus  
30 Templat-bindendem Polymer und Templat mit einer organischen Polymerlösung gemischt, auf ein Substrat gegossen und das Lösungsmittel anschließend ent-

-4-

fernt. Durch Waschen kann das Templat aus dem Film herausgelöst werden, so dass ein kohärenter Polymerfilm mit erkennenden Funktionen resultiert.

- Ein in-situ-Verfahren zur Modifizierung von Mikrotiterplatten mit molekular geprägten Polymeren, welche in den einzelnen Wells der Mikrotiterplatte zu kohärenten, transparenten und kontinuierlichen Filmen verfestigt werden, ist in der DE 198 32 598 A1 beschrieben. Diese Mikrotiterplatten können zur molekularen Erkennung nach dem ELISA-Verfahren eingesetzt werden. Aufgrund des hohen Diffusionswiderstandes innerhalb des Films werden hier nur die Funktionen an der Oberfläche des Polymerfilms ausgenutzt.
- Die Filmbildung von kohärenten Filmen ist ein bekannter Prozess, der ausführlich von Keddie (Mat. Sci. Eng., 1997, 21(3) 101-170) beschrieben wird. Dabei werden drei Stufen zur Bildung eines kohärenten Films aus einer wässrigen kolloidalen Dispersion von Polymerpartikeln beschrieben. Stufe 1: Verdunstung des Wassers und Ordnen der Partikel; Stufe 2: Partikeldeformation; Stufe 3: Interdiffusion von Polymeren über Partikel-Partikelgrenzen hinweg. Dabei erleidet der Latex folgende Umwandlungen: Kolloidale Dispersion → dichte Packung von Partikeln → dicht gepackte Ansammlung von deformierten Partikeln → kontinuierliches und undurchlässiges Material. Dieses Material ist wegen der Undurchlässigkeit per se ungeeignet zur Durchführung von kontinuierlichen Verfahren, zum Beispiel Filtration oder Osmose.

McDonald beschreibt in der WO 95/03878 die Darstellung von durchlässigen Verbundmaterialien aus unterschiedlich modifizierten Latices ausschließlich zur Größentrennung und damit Reinigung von Flüssigkeiten in der Mikro- und Ultrafiltrationstechnik. Die so hergestellten Membranen sind rissfrei, stabil gegenüber Durchfluss von Flüssigkeiten und Gasen sowie stabil gegenüber Rückfluss (back flushing). Funktionelle Gruppen in zusätzlich zugegebenen Monomeren, Surfactants, Oligomeren oder Polymeren - Glycidylmethacrylat, Amid methylol, Methylmethacrylat, Glycidylmethacrylat, Butylacrylat, Acrylsäure, Allylmethacrylat - werden ausschließlich zur Stabilisierung des Verbundmaterials verwendet. Die Ausnutzung der Kavitäten zum stoffabhängigen Transport oder Erkennungsprozessen in drei Dimensionen findet nicht statt und wird auch nicht als Möglichkeit erwähnt.

Die Herstellung molekular geprägter Polymerteilchen via Suspensions- und Bulkpolymerisation ist bekannt und zum Beispiel in den US 5,821,311, US 5,872,198, US 5,959,050 und WO 98/07671 beschrieben. Als "Molekulares Prägen" bezeichnet man eine Technik, die zur Darstellung von sehr hoch vernetzten Polymeren mit spezifischen molekularen Erkennungsfunktionen eingesetzt wird: Funktionelle Monomere werden in Gegenwart von Templatmolekülen, die durch Wechselwirkung mit dem Monomer eine Vorzugsausrichtung erfahren, polymerisiert. Durch Extraktion der Templatmoleküle erhält man ein molekular geprägtes Polymer, welches das Templat oder dem Templat strukturverwandte Molekülspezies durch Wechselwirkung mit den während des Prägeprozesses erzeugten

Hohlräumen wieder selektiv binden kann und daher zur molekülspezifischen Erkennung geeignet ist.

Die Suspensionspolymerisation ermöglicht die kontrollierte Synthese einheitlicher, molekular geprägter Latexteilchen in einem Größenbereich von  
5 2 µm - 100 µm. Aufgrund ihrer Größe sind solche Mikropartikel für medizinische in vivo Applikationen ungeeignet (DE 19 810 965 A1).

Bulkpolymerisate müssen vor ihrem Einsatz zum Beispiel als Füllmaterialien in Chromatographiesäulen mechanisch zerkleinert werden. Prinzipiell sind so gewonnene kleine Partikel völlig unregelmäßig in ihrer Größe und Morphologie. Durch Zerkleinerung gewonnene kleine polymere Partikel können nur verlustreich durch Siebprozess in ihrer Größe sortiert werden. Die Größe der auf diese Weise gewonnenen Partikel liegt typischerweise im Größenbereich von  
15 5 - 500 µm.

Hosoya et al. stellten erstmals ein spezielles mehrstufiges Emulsionspolymerisationsverfahren zur Herstellung geprägter, quervernetzter Polymerbeads (≥ 5,5 µm) aus zum Beispiel Ethylendimethacrylat vor (J. High Resol. Chromatogr. 1999, 22 (5) 256 - 260; J. Chromatogr. A 1996, 728, 139-147; Chemistry  
20 Letters 1997, 1997(6), 555-556). Als Templatmolekül verwendeten sie u.a. Anthracen. Die erhaltenen Beads wurden als Füllmaterial in der HPLC eingesetzt und die Retentionszeiten von Benzol, Naphthalin und Anthracen untersucht. Für die chromatographische Anwendung sind Partikelgrößen von mindestens  
25 3 µm erforderlich.  
30

- 7 -

Eine Technik zur Oberflächen-Templat-Polymerisation unter Einsatz von Mikroemulsionen wurde von Uezu et al. entwickelt (Chemtech 1999, 29(4), 12-18; Journal of Chemical Engineering of Japan 1999 32 (3), 262-267; Journal of Applied Polymer Science 1999, 73 (7), 1223-1230). Es wird zuerst eine wässrige Lösung aus Templatmolekül und Emulgator in einer organischen Lösung aus Monomer und Templatbindenden amphiphilen Surfactant emulgiert und anschließend das Monomer durch Zugabe eines Initiators polymerisiert. Die Templat-bindenden Moleküle lagern sich an der Grenzfläche Wasser/Öl an und erfahren durch die Bindung zum Templat eine Ausrichtung, die während beziehungsweise nach der Polymerisation erhalten bleibt. Durch Entfernung des Lösungsmittels und der Templatmoleküle erhält man ein poröses Polymer mit molekular geprägter, spezifischer innerer Oberfläche. Bei der konventionellen Emulsionspolymerisation findet die Polymerisation innerhalb von micellaren Öltröpfchen statt. Die Oberflächen-Templat-Polymerisation stellt somit ein inverses Verfahren zu einer Emulsionspolymerisation dar. Der Bereich der ursprünglichen Mikroemulsionen bleibt von der Polymerbildung ausgespart und wird nach Ausführung des Prozesses als Hohlraum abgebildet. Polymere lassen sich nach Uezu et al. dadurch einfach und mit zahlreichen wasserlöslichen Templatmolekülen und -atomen wie Aminosäuren, Proteinen und Metallionen prägen. Die Technik ist dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Gruppen tragenden Moleküle, die für den Erkennungsprozess entscheidend sind, nicht kovalent mit dem Polymer verbunden sind. Nur in einem speziellen Fall berichtet Uezu von der Möglichkeit, derartige Molekü-



- 8 -

le nachträglich zum Präge- und Polymerisationsprozess durch Strahlung kovalent am Polymer zu verankern. Der Einsatz Oberflächen-Templat-geprägter Polymere zum Beispiel in Chromatographiesäulen erfordert eine mechanische Zerkleinerung des Materials auf die geeignete Korngröße. Die Bildung elastischer und mechanisch stabiler Polymerfilme ist mit diesem Verfahren nicht möglich.

Der Erfindung liegt also das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung submikroskopischer Polymerpartikel mit molekülspezifisch erkennender Funktion und ein Verfahren zur Generierung von Filmen mit molekülspezifisch erkennender Funktion durch Verarbeitung submikroskopischer Polymerpartikel mit molekülspezifisch erkennender Funktion bereitzustellen, wobei die Funktion der Partikel an der Oberfläche der Filme und/oder im Inneren der Filme erhalten bleibt.

Die Erfindung löst die ihr zugrunde liegende technische Problemstellung durch die Bereitstellung molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisender Nanopartikel mit einem Durchmesser von 5 bis 1000 nm, die erhältlich sind durch

Herstellen einer Emulsion, umfassend mindestens zwei nicht miteinander mischbare Phasen, enthaltend

- a) mindestens ein Monomer,
- b) mindestens ein Molekülspezifität verleihendes Agens,
- c) gegebenenfalls mindestens einen Initiator,

- 9 -

d) gegebenenfalls mindestens einen Vernetzer und

e) mindestens einen Emulgator und

Durchführen einer Emulsionspolymerisation.

5 In besonders bevorzugter Weise kann vorgesehen sein, die Emulsionspolymerisation durch thermisches oder photochemisches Starten einzuleiten. In einer weiteren Ausführungsform kann vorgesehen sein, der Emulsion vor Beginn der Polymerisation ein stabilisierendes Mittel, zum Beispiel ein hydrophobes oder  
10 hydrophiles Agens, hinzuzugeben.

Die Erfindung betrifft in einer besonders vorteilhaften Ausführungsform die vorgenannten Nanopartikel, die erhältlich sind durch

- 15 a) Herstellen eines Monomer-haltigen Gemisches aus mindestens einem Monomer, mindestens einem Molekülspezifität verleihenden Agens, gegebenenfalls mindestens einem Initiator sowie gegebenenfalls mindestens einem Vernetzer,
- b) Herstellen einer Emulgator-haltigen Lösung,
- 20 c) gegebenenfalls Zugabe eines stabilisierenden Mittels, zum Beispiel eines hydrophilen oder hydrophoben Agens, zu dem Gemisch nach a) und/oder der Lösung nach b) und
- 25 d) Durchführen einer Emulsionspolymerisation durch Vereinigen der Emulgator-haltigen Lösung mit dem Monomer-haltigen Gemisch.

- 10 -

Die Erfindung sieht dabei in besonders vorteilhafter Weise vor, dass das die Molekülspezifität verleihende Agens beispielsweise ein Templat sein kann, wobei das zur Herstellung des Monomerhaltigen Gemisches eingesetzte Monomer mindestens eine funktionelle Gruppe aufweist, die zur Interaktion mit dem Templat befähigt ist. Nach Durchführen der Emulsionspolymerisation wird das Templat aus den gebildeten Nanopartikeln herausgewaschen, zum Beispiel herausgelöst beziehungsweise extrahiert.

Erfindungsgemäß kann jedoch auch vorgesehen sein, dass das die Molekülspezifität verleihende Agens ein oberflächenaktives polymerisierbares Monomer, auch als Surfmmer bezeichnet, ist. Dieses oberflächenaktive polymerisierbare Monomer, insbesondere amphiphile Monomer, kann entweder selbst direkt molekülspezifische Erkennungsstellen tragen oder aber nach Durchführung mindestens einer, vorzugsweise milden, chemischen Reaktion molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisen, die beispielsweise hinzugefügt oder demaskiert werden. Diese erfindungsgemäße chemische Reaktion kann sowohl vor als auch nach der Polymerisation erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel werden durch die erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt, die generell Verfahren der Emulsionspolymerisation zugeordnet werden können. Im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren der Suspensionspolymerisation werden dabei wesentlich kleinere Polymerpartikel erhalten.

Bei der Suspensionspolymerisation werden polymerisierbare Monomere in wenige Mikrometer große Tröpf-

chen in einem Dispersionsmittel verteilt und dann innerhalb dieser Tröpfchen durch Zugabe von in den Monomertröpfchen löslichen Initiator-molekülen und Starten der Reaktion polymerisiert. Die Reaktion

5 läuft dabei innerhalb der Tröpfchen weitgehend so ab, wie bei einer Substanzpolymerisation (bulk polymerisation). Man verwendet daher für die Suspensionspolymerisation auch den Begriff der mikrobulk polymerisation. Das Verfahren der Suspensionspoly-

10 merisation ist in Bezug auf minimal erreichbare Polymerpartikelgrößen eingeschränkt. Minimale Partikelgrößen liegen bei wenigen Mikrometern.

Ohne durch die Theorie beschränkt sein zu wollen, erscheint es, als wenn durch die erfindungsgemäße

15 Zusammensetzung der Emulsionen für die Polymerisation wesentlich kleinere Partikel erhalten werden, da die Polymerpartikel anders als in der Suspensionspolymerisation in den Monomertröpfchen in den in wesentlich größerer Zahl vorhandenen Emulgator-

20 stabilisierten Mizellen heranwachsen und dafür die Diffusion der Monomere aus Monomertröpfchen in die Mizellen während des Polymerisationsprozesses eine entscheidende Rolle einnimmt.

Unter Emulgator wird im Zusammenhang mit der vor-

25 liegenden Erfindung ein Mittel verstanden, welches eine Oberflächenaktivität entwickelt, indem es die Grenzfläche zwischen den beiden nicht miteinander mischbaren Phasen stabilisiert. Der Emulgator kann vor Herstellen der Emulsion und Durchführung der

30 Polymerisationsreaktion zugegeben werden und nicht in die entstehenden Polymere eingebunden werden oder kann eingebunden werden. Der Emulgator kann er-

- 12 -

findungsgemäß selbstverständlich auch erst während der Durchführung der Polymerisation gebildet werden, zum Beispiel durch ein neues Molekül oder Ion gebildet aus dem Zerfallsprodukt des Initiatormoleküls und 1 bis 100, vorzugsweise 1 bis 20 Monomereinheiten.

Im Fall der besonders bevorzugten Zugabe eines stabilisierenden Mittels zu der Emulsion, insbesondere bei einer Miniemulsionspolymerisation, scheint es, dass das stabilisierende Mittel die vor der Polymerisation hergestellten Emulgator-stabilisierten Mizellen in ihrer Größenverteilung stabilisiert, indem durch den Aufbau eines osmotischen Druckes infolge der bevorzugten Löslichkeit des stabilisierenden Mittels in den Mizellen der Prozess der Ostwald-Reifung verhindert wird. Ohne Zugabe eines stabilisierenden Mittels scheint es, dass die erfindungsgemäß besonders bevorzugten Mizellengrößen und daraus resultierenden Partikelgrößen nicht stabil wären und durch den vor oder während der Polymerisation ablaufenden Prozess der Ostwald-Reifung eine wesentlich uneinheitlichere Partikelgrößenverteilung mit wesentlich weniger Partikeln in dem erfindungsgemäß besonders bevorzugtem Größenbereich entstehen würde.

Als stabilisierende Mittel werden erfindungsgemäß im Falle der hydrophobe-Phase-in-hydrophile-Phase-Emulsionen, wie Öl-in-Wasser-Emulsionen, hydrophobe Agentien verwendet. Erfindungsgemäß werden im Falle der hydrophile-Phase-in-hydrophobe-Phase-Emulsionen, wie Wasser-in-Öl-Emulsionen, hydrophile A-

- 13 -

gentien verwendet. Erfindungsgemäß können auch Template als stabilisierende Mittel wirken.

Unter Öl wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Mittel verstanden, welches eine organische Phase ist, die mit Wasser nicht oder nur zu einem geringen Teil, vorzugsweise zu weniger als 5 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmenge des hier als Öl bezeichneten Mittels mischbar ist. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff Wasser, reines Wasser ebenso wie wässrige Lösungen verstanden, die zum Beispiel Salze, Säuren, Basen, organische oder anorganische Verbindungen, Komplexe, tierische, pflanzliche, bakterielle Komponenten oder deren Bestandteile oder sonstige Inhaltsstoffe enthalten. Selbstverständlich können die vorgenannten möglicherweise im Wasser enthaltenden Komponenten auch in dem vorstehend definierten Öl vorhanden sein.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff Nanopartikel kolloidale Polymere verstanden, die hier auch als Latexpartikel bezeichnet werden. Diese Nanopartikel können in einer Ausführungsform als quervernetzte Nanopartikel vorliegen, die im vorliegenden Zusammenhang auch als quervernetzte Latexpartikel oder auch als Microgel bezeichnet werden. Oberflächenaktive polymerisierbare Monomere, das heißt Surfmere, enthaltende Nanopartikel sind nicht quervernetzt.

Die erfindungsgemäß hergestellten Nanopartikel mit einem Durchmesser von 5 nm bis 1 µm, vorzugsweise von 10 nm bis 0,8 µm, insbesondere von 20 nm bis

500 nm, liegen vorteilhafterweise in Form von kolloidalen Polymeren, also Latexpartikeln, insbesondere quervernetzten Latexpartikeln, also Microgelen, vor und ermöglichen in besonders vorteilhafter Weise die molekülspezifische Erkennung von Ziel- oder Targetmolekülen, wie Proteinen, pharmazeutischen Wirkstoffen, sonstigen Wert- oder Schadstoffen biotischen oder synthetischen Ursprungs, Bakterien, Viren, Viroiden, Prionen, Nucleinsäuren, Kofaktoren, Vitaminen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, niedermolekularen organischen Verbindungen, höhermolekularen organischen Verbindungen und ähnlichem.

Erfindungsgemäß wird es ermöglicht, in einem Emulsionspolymerisationsverfahren, insbesondere einem Mini- oder Mikroemulsionspolymerisationsverfahren, in einem einstufigen Verfahren molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisende polymere Nanopartikel in einem Größenbereich von 5 bis 1000 nm zu synthetisieren. Erfindungsgemäß können die molekülspezifischen Erkennungsstellen durch Einpolymerisieren von Templaten während der Emulsionspolymerisation und anschließendes Auswaschen oder durch Einpolymerisieren von oberflächenaktiven polymerisierbaren Monomeren hergestellt werden. Erfindungsgemäß kann auch vorgesehen sein, die beiden vorgenannten Verfahren zur Einführung molekülspezifischer Erkennungsstellen zu kombinieren, das heißt in das Monomer-haltige Gemisch Template und oberflächenaktive polymerisierbare Monomere hinzuzugeben. Auf diese Weise werden molekülspezifische Erkennungsstellen in den erfindungsgemäßen Nanopartikeln sowohl durch die durch die herausgewaschenen Template gebildeten Kavitäten als auch durch die eingebauten oberflä-

- 15 -

chenaktiven polymerisierbaren Monomeren bereitgestellt.

Erfindungsgemäß werden durch die erfindungsgemäße Vorgehensweise diskrete Partikel in kolloidaler Lösung erhalten, die über einen langen Zeitraum, vorzugsweise über sechs Monate, stabil ist. Die erhaltenen Polymere weisen eine partikuläre Struktur auf. Diese partikuläre Struktur ist weitgehend homogen, was einen weiteren Vorteil darstellt. So werden die herkömmlicherweise verwendeten Bulkpolymerisate für Anwendungen zum Beispiel in der Chromatographietechnik durch zeitaufwändige und kostspielige Verfahren mechanisch zerkleinert. Prinzipiell sind die so gewonnenen kleinen Partikel völlig unregelmäßig in ihrer Größe und Morphologie. Der Einsatz von Siebprozessen führt zu Verlusten. Die auf diese Weise gewonnenen Partikel weisen typischerweise Größen von 5 µm bis 500 µm auf. Die im Rahmen der konventionellen Suspensionspolymerisation gewonnenen molekülspezifischen Erkennungsstellen aufweisenden Polymerteilchen weisen Größen von 2 bis 100 µm auf. Erfindungsgemäß kann nun die Herstellung von molekulare Erkennungsstellen aufweisenden Partikeln im Größenbereich von 5 nm bis 1000 nm realisiert werden.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren herstellbaren Partikel sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass ihre Größe wesentlich geringer ist als die der durch Suspensionspolymerisation herstellbaren Partikel und die in ihrer Morphologie wesentlich einheitlicher sind, als alle durch herkömmliche mechanische Verfahren herstellbaren Par-



tikel. Insbesondere werden die Grenzflächeneigenschaften der erfindungsgemäßen Partikel durch den Herstellungsprozess steuerbar. Die erfindungsgemäßen Partikel sind in kolloidaler Form leicht zu verarbeiten und für viele Anwendungen einsetzbar.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter molekülspezifischen Erkennungsstellen Bereiche des Nanopartikels verstanden, die eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Nanopartikel und Zielmolekülen, wie Liganden, ermöglichen. Die Wechselwirkung kann auf gerichteter attraktiver Wechselwirkung zwischen einem Paar, vorzugsweise mindestens zwei Paaren, aus funktionellen Gruppen des Nanopartikels und funktionellen Gruppen der Zielmoleküle beruhen. Einzelne interagierende Paare funktioneller Gruppen zwischen Nanopartikel und Zielmolekül sind jeweils räumlich fixiert an dem Nanopartikel und dem Zielmolekül angeordnet. Diese Fixierung braucht keine starre Anordnung zu sein, sondern kann vielmehr durchaus flexibel ausgeführt sein. Die attraktive Wechselwirkung zwischen den funktionellen Gruppen der Nanopartikel und der Zielmoleküle kann in Form von nicht-kovalenten Bindungen wie van-der-Waals-Bindungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen,  $\pi$ - $\pi$ -Bindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen oder hydrophoben Wechselwirkungen ausgeführt sein. Denkbar sind auch reversible kovalente Bindungen ebenso wie Mechanismen, die auf Komplementarität der Gestalt oder Form beruhen. Die erfindungsgemäß vorgesehene Wechselwirkung zwischen den molekülspezifischen Erkennungsstellen der Nanopartikel und dem Zielmolekül beruhen also auf gerichteten Wechselwirkungen zwischen den Paaren aus

- 17 -

funktionellen Gruppen und auf der räumlichen Anordnung dieser die Paarbildung eingehenden Gruppen zueinander an dem Nanopartikel sowie dem Zielmolekül.

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden molekülspezifische Erkennungsstellen durch molekulares Prägen, den Einbau oberflächenaktiver polymerisierbarer Monomere oder beides bereitgestellt. Unter molekularem Prägen wird erfindungsgemäß die Polymerisation von Monomeren in Gegenwart von Templaten verstanden, die mit dem Monomer einen während der Polymerisation relativ stabilen Komplex bilden können. Nach dem Auswaschen der Template können die so hergestellten Materialien Templatmoleküle, den Templatmolekülen strukturverwandte Molekülspezies oder Moleküle, die den Templatmolekülen oder Teilen davon strukturverwandte oder identische Gruppen aufweisen, wieder spezifisch binden. Ein Templat ist daher eine in der Monomermischung während der Polymerisation vorhandene Substanz, zu der das gebildete Polymer eine Affinität aufweist.

Erfindungsgemäß kann jede Substanz mit definierter dreidimensionaler Gestalt oder Form als Templat für die Modifizierung von Nanopartikeln dienen. Erfindungsgemäß können sowohl kleine Moleküle mit Molekülmassen unter 100 Da als auch Partikel wie Viren, Bakterien, Zellen oder Zellorganellen als Templat dienen. Erfindungsgemäß können auch organische Verbindungen wie Aminosäuren, zum Beispiel Tryptophan oder Phenylalanin, Aminosäurederivate wie Bocphenylalaninanilid, Tryptophanmethylester, Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Nucleinsäuren, Kofaktoren, Farbstoffe, Vitamine, Antikörper, Glycoproteine,

- 18 -

Proteoglycane, Lektine, Monosaccharide, Disaccharide, Polysaccharide, Glycosaccharide oder heterozyklische Verbindungen als Templat verwendet werden.

Das Herauslösen des Templats nach dem Emulsionspolymerisationsvorgang kann beispielsweise durch Verwenden einer Salzlösung mit einer zur Dissoziation ausreichenden Ionenstärke geschehen. Selbstverständlich ist es auch möglich, Säuren einzusetzen, die die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Templat und Polymerisat stören. Beim Herauslösen werden in den Poren und/oder an der Oberfläche der Nanopartikel die zur Templatstruktur komplementären Bindungsstellen freigesetzt.

Die Erfindung betrifft allerdings nicht nur Nanopartikel mit herausgelösten Templaten, sondern auch Nanopartikel, in denen oder an denen nicht herausgelöste Template noch, zumindest teilweise, gebunden sind.

Die Erfindung betrifft auch Nanopartikel, in die durch den Einbau oberflächenaktiver polymerisierbarer Monomere in Kombination mit molekularem Prägen oder ohne molekulares Prägen molekülspezifische Erkennungsstellen eingebracht wurden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter oberflächenaktiven polymerisierbaren Monomere, also Surfmeren, amphiphile Monomere verstanden, die Vinyl-Monomere, zum Beispiel Methacryl-, Acryl-, Acrylamid-, Methacrylamid-, Maleinimid-, Citraconimid-, Itaconimid-, Styrol- oder Styrolsulfon-Monomere, mit hydrophoben Segmenten, zum

Beispiel Methylen-, Ethylenoxid- oder Butylenoxid-Segmenten, und hydrophilen reaktiven Endgruppen wie Ether-, Ester-, Sulfonium-aktivierte Ester-, Sulfat-, Pyridinium, Halogenalkylammonium- oder Succinimidester-Gruppen, sein können. Beispiele dafür sind Vinylalkyloxyloxyphenyldimethylsulfoniumsalz, Alkylpyridiniumbromidmaleinsäurediester, Bromalkylammoniummethacrylat,  $\omega$ -Acrylamido-alkanoyloxyphenyldimethylsulfonium methylsulfat und Natrium-methacryloylalkylsulfat sowie Derivate dieser Verbindungen.

Die oberflächenaktiven polymerisierbaren Monomere weisen in einer Ausführungsform selbst molekülspezifische Erkennungsstellen auf, die Zielmoleküle erkennen und binden können. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die oberflächenaktiven polymerisierbaren Monomere nach Einpolymerisation erst durch eine nachfolgende sanfte chemische Reaktion mit molekülspezifischen Erkennungsstellen belegt werden. Dies kann durch Hinzufügen entsprechender Erkennungsstellen oder aber durch Demaskieren oder sonstiges Modifizieren geschehen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter Zielmolekülen sämtliche Moleküle, Teile davon oder diese Moleküle tragenden Einheiten wie Zellen, Bakterien, Viren etc. verstanden, die von molekülspezifischen Erkennungsstellen erkannt und gebunden werden können. Beispiele für solche Zielmoleküle sind die vorgenannten Template.

Die Erfindung sieht vor, dass zur Herstellung eines Monomer-haltigen Gemisches mindestens ein Monomer

- 20 -

- mit mindestens einem Molekülspezifität verleihenden Agens, also einem Templat und/oder einem oberflächenaktiven polymerisierbaren Monomer vermischt wird. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, dass
- 5 das vorgenannte Monomer gleichzeitig auch das oberflächenaktive polymerisierbare Monomer darstellt. Es kann aber auch sein, dass verschiedene Monomere in dem Monomer-haltigen Gemisch vorliegen und demgemäß eine Copolymerisation durchgeführt wird.
- 10 Erfindungsgemäß kann das Monomer ein hydrophiles Monomer sein. Monomere mit hydrophilem Charakter werden in einer konventionell durchgeführten Öl-in-Wasser-Emulsionspolymerisation nicht oder nur in sehr geringer Rate in die gebildeten Polymere eingebaut, da das Polymerwachstum in der Ölphase
- 15 stattfindet, hydrophile Monomere aber mit großem Verteilungsüberschuss in der Wasserphase gelöst sind. Überraschenderweise konnte durch die erfindungsgemäße Verfahrensweise ein Verfahren bereitgestellt werden, gemäß dem sowohl hydrophobe als auch hydrophile Monomere in das hergestellte Polymer durch Copolymerisation eingebunden werden.
- 20

- Ohne durch die Theorie beschränkt sein zu wollen, erscheint es, als wenn durch die erfindungsgemäß
- 25 besonders bevorzugte Zugabe eines stabilisierenden Mittels im Rahmen des erfindungsgemäßen Emulsionspolymerisationsverfahrens die Diffusion von hydrophilen Monomeren durch die wässrige Phase so eingeschränkt oder verhindert wird, dass eine erfolgreiche Polymerisation in der Ölphase stattfinden kann. Erfindungsgemäß können also sowohl hydro-
- 30

- 21 -

phobe als auch hydrophile Monomere in die Nanopartikel eingebaut werden.

- Erfindungsgemäß kann der eingesetzte Vernetzer ein hydrophober oder ein hydrophiler Vernetzer sein.
- 5 Vernetzer können zum Beispiel Acrylatderivate wie Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA), N, N'-Methylenbisacrylamid, Trimethylolpropantrimethacrylat oder Bisphenol A® oder Styrolerivate wie Divinylbenzol oder Diallylweinsäurediamid sein.
- 10 Ebenso kann der Initiator öl- oder wasserlöslich sein. Beispiele für geeignete Initiatoren sind Azoderivate, wie  $\alpha, \alpha'$ -Azoisobutyronitril, 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril), 1,1'-Azodi(hexahydrobenzonitrid), oder Peroxide wie Bis( $\alpha$ - $\alpha$ -
- 15 dimethylbenzyl)peroxid oder Kaliumperoxodisulfat.

- Als Monomer können acrylische Monomere, zum Beispiel Methacrylsäure, Acrylsäure, Acrylamid oder Methylmethacrylat, oder vinylische Monomere, zum Beispiel Vinylpyrrolidon, Vinylpyridin, Ethylstyrol,
- 20 Vinylimidazol oder Itaconsäure verwendet werden.

- Als Emulgator können ionische Emulgatoren, zum Beispiel Natriumdodecylsulfat oder Hexadecylsulfonsäure, kationische Emulgatoren, zum Beispiel Hexadecyltrimethylammoniumbromid oder Dodecylpyridiniumchlorid, oder nichtionische Emulgatoren, zum Beispiel die Brij-Reihe, insbesondere Brij 72®, die Span-Reihe, insbesondere Span 20® oder Span 80, oder die Tween-Reihe, insbesondere Tween 80® verwendet werden.
- 25
- 30 Der Emulgator wird vorzugsweise in Was-

- 22 -

ser beziehungsweise Cyclohexan im Falle der inversen Emulsion gelöst. Als Emulgator kann auch das Molekülspezifität verleihende Agens, insbesondere das oberflächenaktive polymerisierbare Monomer  
5 oder/und das Templat, verwendet werden.

Bezogen auf die Monomere setzt sich das Reaktionsgemisch bevorzugt wie folgt zusammen:

- Molares Verhältnis Vernetzer zu Monomer: 1:2 bis 1:4, falls Vernetzer vorhanden.
- 10 - Molares Verhältnis Monomer zu oberflächenaktivem Monomer: 1:5 bis 10:1, falls letzteres vorhanden.
- Molares Verhältnis Monomer zu Templat: 1:4 bis 1:10, falls letzteres vorhanden.
- 15 - 1 bis 5 Mol% stabilisierendes Mittel, falls vorhanden.
- 0,5 bis 2 Mol% Initiator, falls vorhanden.
- 0,2 bis 50 Mol% Emulgator.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel werden vorzugsweise in Form einer kolloidalen Dispersion, also  
20 von Latices, insbesondere quervernetzten Latices, also Mikrogele, erhalten.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können auch in Form von Mikrogelen erhalten werden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter  
25 Mikrogelen durch den erfindungsgemäß bevorzugt vorgesehenen Einsatz von Vernetzern hergestellte quervernetzte Latices verstanden.

- 23 -

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisender Nanopartikel, insbesondere der vorgenannten Art, mit einem Durchmesser von 5 bis 1000 nm, wobei  
5 eine mindestens zwei nicht miteinander mischbare Phasen, zum Beispiel eine hydrophile und eine hydrophobe Phase, umfassende Emulsion hergestellt wird, die

- a) mindestens ein Monomer,
- 10 b) mindestens ein Molekülspezifität verleihendes Agens,
- c) in bevorzugter Ausführungsform mindestens einen Initiator,
- d) in bevorzugter Ausführungsform mindestens einen  
15 Vernetzer und
- e) mindestens einen Emulgator aufweist

und anschließend eine Emulsionspolymerisation durchgeführt wird, die in besonders bevorzugter Ausführungsform durch thermisches oder photochemisches Starten initiiert wird.  
20

Erfindungsgemäß kann in besonders bevorzugter Ausführungsform vorgesehen sein, der Emulsion, insbesondere zur Durchführung einer Miniemulsion, ein stabilisierendes Mittel, zum Beispiel ein hydrophiles oder hydrophobes Agens, zum Beispiel Hexadecan,  
25 hinzuzugeben.

Die Erfindung betrifft in bevorzugter Ausführung auch vorgenannte Verfahren zur Herstellung molekül-



- 24 -

spezifische Erkennungsstellen aufweisender Nanopartikel, insbesondere der vorgenannten Art, mit einem Durchmesser von 5 bis 1000 nm, wobei ein Monomerhaltiges Gemisch aus mindestens einem Monomer, mindestens einem Molekülspezifität verleihenden Agens, gegebenenfalls mindestens einem Initiator und gegebenenfalls mindestens einem Vernetzer sowie eine Emulgator-haltige Lösung hergestellt werden, wobei das Monomer-haltige Gemisch und/oder die Emulgator-haltige Lösung mit einem stabilisierenden Mittel, zum Beispiel Hexadecan versetzt und wobei eine Emulsionspolymerisation durch Vereinigen der Emulgator-haltigen Lösung mit dem Monomer-haltigen Gemisch und anschließendem thermischen oder photoinitierten Starten der Reaktion durchgeführt und eine die Nanopartikel enthaltende Suspension erhalten wird, welches anschließend gegebenenfalls durch zum Beispiel Filtration, insbesondere Diafiltration, so aufgereinigt werden kann, dass molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisende Latices erhalten werden. Selbstverständlich ist es möglich, das stabilisierende Mittel nicht nur nach Herstellen des Monomer-haltigen Gemisches und/oder der Emulgator-haltigen Lösung hinzuzugeben, sondern auch bereits während der Herstellung.

Die Erfindung sieht also vor, dass eine bestimmte Menge an Emulgator in einer entsprechenden Menge Lösungsmittel, vorzugsweise Wasser oder Cyclohexan, gelöst wird. In einem getrennten Behältnis werden die Monomere mit einem Templat und/oder einem oberflächenaktiven polymerisierbaren Monomer sowie einem stabilisierenden Mittel und dem Initiator sowie gegebenenfalls dem Vernetzer gemischt. Beide Lösun-

- 25 -

gen werden vereinigt, gründlich gerührt und gegebenenfalls mit einem Sonifier, der mit einer Sonotrode, vorzugsweise Mikrosonotrode, ausgestattet ist, beschallt.

- 5   Anschließend wird wahlweise thermisch oder photochemisch polymerisiert. Bei der thermischen Polymerisation wird die Temperatur auf 60 bis 100°C, insbesondere 80°C erhöht. Dieser Polymerisations-
- 10  schritt kann beispielsweise 10 bis 20, insbesondere aber 16 Stunden, andauern. Anschließend wird die Temperatur erhöht, zum Beispiel um 5 bis 30°C, insbesondere um 10°C auf 90°C, und danach die Reaktion beendet. Bei der photoinitierten Polymerisation
- 15  wird das Reaktionsgefäß in einem Eisbad gekühlt, mit einer Standard UV-Lampe bestrahlt, vorzugsweise bei 366 nm, und 10 bis 20 Stunden, insbesondere aber 16 Stunden, polymerisiert und anschließend die Reaktion abgebrochen.

- 20  Eine Aufreinigung kann zum Beispiel über Ultrafiltration, Dialyse, Ausfällen der Mikrogele beziehungsweise Latices oder Ionenaustauscher erfolgen.

- Die Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform eine Emulsionspolymerisation, die als hydrophobe-Phase-in-hydrophile-Phase-Emulsionspoly-
- 25  merisation, wie eine Öl-in-Wasser-Emulsionspolymerisation, ausgeführt wird. Die Erfindung betrifft selbstverständlich jedoch auch eine hydrophile-Phase-in-hydrophobe-Phase-Emulsionspolymerisation, wie Wasser-in-Öl-Emulsionspolymerisation, also eine
- 30  inverse Emulsionspolymerisation.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Durchführung einer Saatpolymerisation zu vorzugsweise Kern-Schale-Latices vorgesehen, wobei das Templat und/oder das oberflächenaktive polymerisierbare Monomer sowohl in der Saat beziehungsweise im Kern als auch in der Schale eingebaut sein können. Die Zugabe der einzelnen Komponenten, insbesondere der Monomere, erfolgt in bevorzugter Weise kontinuierlich. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden Saatlatitudes mit Teilchengrößen von 5 bis 1000 nm und Kern-Schale-Latices mit Teilchengrößen von 50 bis 1000 nm erhalten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, eine Mikro- oder Miniemulsionspolymerisation durchzuführen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer Miniemulsionspolymerisation eine Polymerisation verstanden, gemäß der Teilchengrößen von 20 bis 500 nm erhalten werden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer Mikroemulsionspolymerisation eine Polymerisation verstanden, gemäß der Teilchen von 5 bis 50 nm erhalten werden.

Wie bereits erläutert, sieht die Erfindung in einer Ausführungsform vor, dass das eingebaute Templat nach der Emulsionspolymerisation aus den gebildeten Nanopartikeln herausgelöst wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Emulsionspolymerisation thermisch gestartet, insbesondere bei Temperaturen von 60 bis 100°C, insbesondere 70 bis 90°C, vorzugsweise 80°C. Vorzugsweise kann vorgesehen sein, die Temperatur stu-

fenweise zu erhöhen. Die so hergestellten Nanopartikel sind aufgrund ihrer geringen Größe in besonders vorteilhafter Weise für diagnostische und therapeutische, zum Beispiel auch in vivo, Anwendungen geeignet, zum Beispiel, um mittels ihrer Molekülspezifität Zielstrukturen einbringen, neutralisieren, abfangen, detektieren oder zerstören zu können.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Nanopartikel katalytische Funktionen ausüben. Dies kann auch in in vivo-Anwendungen ausgenutzt werden.

Die so hergestellten Nanopartikel sind in kolloidaler Form leicht zu verarbeiten und für viele Anwendungen einsetzbar. So lassen sich durch Filtration partikuläre Nanoschichten, die ein- oder mehrschichtig sein können, herstellen. Diese Nanoschichten können aufgrund der starken Quervernetzung der in ihnen enthaltenen molekular geprägten Polymerteilchen mit einer Größe von 5 bis 1000 nm zu partikulären Filmen verfestigt werden. Diese Filme oder Membranen weisen also eine partikuläre Grundstruktur insofern auf, als dass die sie bildenden Nanopartikel in ihnen im Wesentlichen in ihrer ursprünglichen Größe erhalten bleiben. Im Gegensatz zur Bildung kontinuierlicher Filme hat diese erfindungsgemäße Vorgehensweise den Vorteil, dass die spezifische Erkennung von Molekülen nicht nur an der Oberfläche des Polymerfilms abläuft, sondern auch die interpartikulären Zwischenräume im Film dazu ausgenutzt werden können. Erfindungsgemäß konnte die spezifische Erkennung von Molekülen in-

- 28 -

nerhalb eines Polymerfilms daher erstmals von zwei auf drei Dimensionen ausgedehnt werden.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung eines Films oder einer Membran nach einem der vorhergehenden Verfahren, wobei mindestens ein Latex der vorgenannten Art mindestens einem Filtrationsschritt sowie einer vorzugsweise durchgeführten Trocknung ausgesetzt und ein partikulärer ein- oder mehrschichtiger Film oder Membran erhalten wird. In den so erhaltenen Filmen oder Membranen liegen interpartikuläre Zwischenräume vor, denen große Bedeutung insofern zukommt, als dass sie als Oberflächen mit molekülspezifisch erkennender Funktion im Film die Trennleistung der Membran entscheidend verbessern. Ein zu trennendes Stoffgemisch wird nicht nur ausschließlich aufgrund der Größe der Stoffe, sondern zusätzlich aufgrund seiner stofflichen Beschaffenheit durch die molekülspezifische Erkennung an der Partikeloberfläche und innerhalb des Partikels aufgetragen. Derartig hergestellte funktionelle polymere Kompositmembranen oder -filme können zum Beispiel in der Sensortechnik, in der Biomedizintechnik oder allgemein in der Separationstechnik, wie Filtration oder Osmose, Anwendung finden, insbesondere in der Flüssigchromatographie der kapillaren Elektrochromatographie oder der Festphasenextraktion.

Die Erfindung betrifft insbesondere die vorgenannten Filme oder Membrane, die eine Dicke von 10 nm bis 1000  $\mu\text{m}$ , insbesondere 10 nm bis 500  $\mu\text{m}$  aufweisen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Filme oder Membrane auf einem Substrat aufgebracht, welches zum Beispiel eine Sensoroberfläche, ein Stent, eine Filtermembran, ein Hohlfasermodul;  
5 ein Metall, ein Halbmetall wie Silizium, ein Metalloxid, Glas, Papier, ein Kunststoff wie Polyester, Polyarylsulfon, Polyethersulfon, Polyphenylsulfon, Polyvinylsulfon, Polystyrol, Polycarbonat, Polyethylen, Polypropylen, Polyacetylen, Polyvinyl-  
10 piridin und Derivate, Polyvinylidenfluorid, Polyvinylchlorid, Polyvinylpyrolidon, Polytetrafluorethylen und Derivate, Nylon, Polyphenyloxid, verflochtene und verfilzte Fasern, mikroporöse Keramiken, Graphit, rostfreier Stahl, eine Membran, ein Filter,  
15 ter, eine Folie oder ähnliches ist.

Die Erfindung betrifft auch einen vorgenannten Film oder Membran, wobei der Film oder die Membran mechanisch stabil und/oder permeabel und/oder regenerierbar ist. Im Zusammenhang mit der vorliegenden  
20 Erfindung wird unter regenerierbar die Eigenschaft eines Films, Membran oder auch eines Nanopartikels der Erfindung verstanden, gemäß der die molekularen Erkennungsstellen Zielmoleküle erkennen, binden und die Zielmoleküle auch wieder so abgelöst werden  
25 können, dass neue Zielmoleküle erkannt und gebunden werden können. Die Erfindung betrifft daher Filme, Membranen oder Nanopartikel, die sowohl reversibel als auch irreversibel mit ihren molekularen Erkennungsstellen Zielmoleküle binden.

30 Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung eines geträgerten erfindungsgemäßen Films oder Membran. In vorteilhafter Weise wird der

- 30 -

Träger vor der Beschichtung mit dem Film oder der Membran vorbehandelt.

Die Figuren zeigen:

- 5      Figur 1      zeigt die Topographie einer gemäß Beispiel 5 mit Mikrogel beschichteten Filtrationsmembran/Kompositmembran.
- Figur 2      zeigt eine REM-Aufnahme (Rasterelektronenmikroskopie) eingetrockneter Partikel eines erfindungsgemäßen Mikrogels.
- 10     Figur 3      zeigt die Ergebnisse mehrerer UV-spektroskopischer Untersuchungen.
- Figur 4      zeigt Isothermen der Titration von L-BFA geprägtem und ungeprägtem Mikrogel auf D-BFA und L-BFA.
- 15     Figur 5      zeigt  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von reinem L-BFA, L-BFA geprägtem Mikrogel und Mikrogel nach Templatextraktion.
- Figur 6      zeigt ein Massenspektrum der MALDI-TOF-MS-Messung von Latexpartikeln, an deren
- 20                    Oberfläche Streptavidin gebunden ist.

#### Ausführungsbeispiel 1

- 72 mg des Emulgators SDS werden in 50 g Wasser unter Rühren gelöst. In einem zweiten Behälter werden 5,0 g Vernetzer (EGDMA) und 1,0 g Monomer (MAA) gemischt und 492 mg des Templats (Boc-Phenylalaninanilid, BFA) sowie 120 mg des Initia-
- 25

- 31 -

tors (2,2'-Azobis-(2-methylbutyronitril)) und 250 mg Hexadecan darin gelöst. Die beiden Lösungen werden vereinigt und eine Stunde lang auf höchster Stufe des Magnetrührers gerührt. Anschließend wird  
5 die Emulsion zwei Minuten bei 50% Amplitude in einer Sonifier-Vorrichtung beschallt. Die Emulsion wird hierbei in ein Eisbad gestellt. Sofort im Anschluss wird 16 h bei 80°C polymerisiert. Gegen Ende der Reaktion wird die Ölbadtemperatur für eine  
10 Stunde auf 90°C erhöht, um einen möglichst hohen Umsatz zu gewährleisten.

Nach Beendigung der Reaktion wird das gebildete Koagulat durch Filtration abgetrennt und der Feststoffgehalt der Probe bestimmt. Die Teilchengröße  
15 wird mittels einer Zetasizer 3000HS-Vorrichtung der Firma Malvern bestimmt. Sie liegt für geprägte Latices dieser Zusammensetzung zwischen 180 und 195 nm.

#### Ausführungsbeispiel 2

20 In 50 g Wasser werden 72 mg Natriumdodecylsulfat gelöst. In einem zweiten Behältnis mischt man 5,0 g Divinylbenzol mit 1,0 g Methacrylsäure und löst darin 120 mg des Initiators 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril), 250 mg Hexadecan und 200 mg  
25 Templat. Die beiden Lösungen werden vereinigt und eine Stunde lang auf höchster Stufe des Magnetrührers gerührt. Anschließend wird die Emulsion zwei Minuten bei 50% Amplitude in einer Sonifier-Vorrichtung beschallt. Die Emulsion wird hierbei in  
30 ein Eisbad gestellt. Anschließend erfolgt die thermisch initiierte Polymerisation bei 80°C über 16 h.



- 32 -

Gegen Ende der Reaktion wird die Ölbadtemperatur für eine Stunde auf 90°C erhöht, um einen möglichst hohen Umsatz zu gewährleisten.

Die mittlere Partikelgröße liegt bei 220 nm.

5

#### Ausführungsbeispiel 3

600 mg Span 80® werden in 60 g Cyclohexan unter Rühren gelöst. In 5 g Wasser löst man 250 mg N,N'-Methylenbisacrylamid und 65 mg Acrylamid sowie 35  
10 mg Mandelsäure und 7 mg Kaliumperoxodisulfat. Beide Lösungen werden vereinigt und 1 h auf höchster Stufe des Magnetrührers gerührt. Anschließend wird die Probe 2 min bei 50% Amplitude in einer Sonifizier-Vorrichtung gestellt, die mit einer Mikrosontrode  
15 ausgestattet ist. Dann wird 5 h bei 70°C und eine weitere Stunde bei 80°C polymerisiert.

#### Ausführungsbeispiel 4

In 45 g Cyclohexan werden 460 mg Span 80® gelöst. In einem zweiten Behältnis werden 500 mg Diaminweinsäurediallylamid, 125 mg Acrylamid, 72 mg Mandelsäure und 7 mg Kaliumperoxodisulfat in 3 g Was-  
20 ser gelöst. Nach Vereinigung beider Lösungen wird eine Stunde auf höchster Stufe des Magnetrührers gerührt und daraufhin 2 Minuten bei 50% Amplitude  
25 in einer Sonifizier-Vorrichtung beschallt. Polymerisiert wird für 16 h bei 70°C.

## Ausführungsbeispiel 5

Eine geeignete Filtrationsmembran wird als Träger gewählt und vor der Beschichtung 15 Minuten in Wasser gelegt. Die Beschichtung erfolgt in einer Amicon-Filtrationszelle, in welche die Membran eingespannt wird. Ein bestimmtes Volumen einer Latex-Suspension mit einem definierten Gehalt an kolloidalem Latex wird in die Zelle eingefüllt und mit leichtem Überdruck durchfiltriert. Über die Konzentration der Suspension oder deren Volumen kann die gewünschte Schichtdicke eingestellt werden.

Die beschichteten Membranen werden zunächst bei 40°C und 70% relativer Luftfeuchtigkeit drei Stunden getrocknet und anschließend noch eine Stunde bei 120°C. Figur 1 zeigt eine wie vorstehend beschichtete Filtrationsmembran. Deutlich zu erkennen ist die partikuläre Struktur des aufgetragenen Mikrogels, also der Oberfläche der Kompositmembran. Die Aufnahme entstand mittels Atomarer Kraftmikroskopie (Rasterkraftmikroskopie, AFM).

## Ausführungsbeispiel 6

Mittels einer Miniemulsionspolymerisation wurden molekular geprägte Mikrosphären beziehungsweise Nanopartikel und Mikrogele hergestellt.

5,4 g (27,25 mmol) Vernetzer (EGDMA; Sigma (vor Gebrauch mit 10 % NaOH gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und destilliert) oder DVB, Divinylbenzol), 0,6 g (6,9 mmol) funktionales Monomer (Methacrylsäure, MAA), 250 mg Hexadecan als hydrophobes Agens

und 120 mg 2,2'-Azobis (2-Methylbutyronitril) wurden gemischt. Die mittels Miniemulsionspolymerisation hergestellten vernetzten Mikrogele wurden mit und ohne Templat hergestellt. Im Falle des molekularen Prägens wurde ein Enantiomeren-reines L- oder D-Boc-Phenylalaninanilid (L-oder D-BFA) (495 mg, 1,4 mmol) zugegeben. 72 mg Natriumdodecylsulfat SDS, als oberflächenaktives Agens, wurden in 50 g Wasser gelöst. Die Lösungen wurden gemischt, eine Stunde kräftig gerührt und anschließend 2 Minuten beschallt (Branson Digital Sonifier, Modell 450-D, 60 % Leistung). Die Polymerisation wurde thermisch bei 80°C für 16 Stunden initiiert. Sich gegebenenfalls bildende Coagulate wurden durch Filtration entfernt. Die Mikrogele wurden anschließend mittels Diafiltration (Amicon 8400 Ultrafiltrationszelle, Membran Polysulfon) gereinigt. Unter Verwendung unterschiedlicher Vernetzermengen wurden unterschiedliche Verhältnisse von Monomer zu Vernetzer eingesetzt.

Das molare Verhältnis des funktionalen Monomers zu dem Vernetzer  $n_{\text{MMA}}/n_{\text{CL}}$  betrug 1:2,2, 1:4 oder 0 im Falle von EGDMA und 1:3,3 oder 0 im Fall von DVB (Divinylbenzol) als Vernetzer.

Die Miniemulsionen wurden in Mikrogele mit einer Effizienz zwischen 90 und 95 % konvertiert. Die erhaltenen erfindungsgemäßen Mikrogele wurden mittels Dynamic Light Scattering (Dynamische Lichtstreuung), gravimetrischer Analysen, Oberflächenspannungstitration, Gasabsorptionsmessungen und Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert. Figur 2 zeigt ein wie vorstehend erhaltenes Mikrogel mit

seiner partikulären Struktur, wobei zu erkennen ist, dass die Mikrogele Durchmesser von 50 - 250 nm aufweisen und die Verteilung der sphärischen Partikel diskret ist.

- 5 Die durchschnittlichen Partikeldurchmesser betrugen  $200 \pm 25$  nm (gemessen mit dynamischer Lichtstreuung, diese Meßmethode wurde für alle im folgenden aufgeführten Durchmessermessungen eingesetzt). Der Durchmesser der molekular geprägten Mikrogele um-
- 10 fassend MAA-co-EGDMA betrugen 217 nm, 204 nm, 220 nm und 215 nm. Die entsprechenden nicht molekular geprägten Mikrogele zeigten eine größere Variation der Durchmesser mit 187 nm, 255 nm und 209 nm. Die DVB enthaltenen Mikrogele wiesen Durchmesser von
- 15 222 nm, 188 nm und 222 nm auf. Die Größenvarianz  $\sigma^2$  aller Mikrogele betrug  $\sigma^2 = 0,12$  bis  $0,14$ .

- Die Oberflächenspannung  $\sigma$  wurde nach Reaktionsabschluss an der Luft-Wasser-Grenzfläche gemessen. Alle Miniemulsionen enthielten dieselbe Menge an
- 20 SDS und die Oberflächenspannung zeigt daher direkt die Menge freien SDS in Lösung an. Je höher die gemessene Oberflächenspannung  $\sigma$  ist, desto geringer ist der Gehalt an SDS in Lösung und umso mehr SDS muss von den gebildeten Mikrogelen adsorbiert wor-
- 25 den sein. Die Oberflächenspannung  $\sigma$  wurde für das System MAA-co-EGDMA als konstant ermittelt, unabhängig von dem molaren Verhältnis oder der Abwesenheit oder Anwesenheit des Templats mit  $\sigma = 43,4 \pm 1,2$  mN m<sup>-1</sup>. Das reine EGDMA-Mikrogelreaktions-
- 30 gemisch zeigt eine beträchtlich höhere Oberflächenspannung nach erfolgter Polymerisation mit  $\sigma = 62,1$  mN m<sup>-1</sup>. Die Poly(MAA)-co-(DVB) Reaktionsgemische

- zeigten eine Oberflächenspannung  $\sigma$  von 59,6 mN m<sup>-1</sup> oder 55,6 mN m<sup>-1</sup> in der Gegenwart oder Abwesenheit des Templats. Polymerisation reinen DVBs führte zu einer Oberflächenspannung von  $\sigma = 64,4$  mN m<sup>-1</sup>. Dieser Wert befindet sich in derselben Größenordnung wie für reine EGDMA-Mikrogele. Alle MAA enthaltenden Miniemulsionsreaktionsgemische zeigten eine erheblich geringere Oberflächenspannung als reine Vernetzungssysteme.
- 10 Die Topologie der Mikrogele im trockenen Zustand wurde mittels Stickstoffadsorptions- und gravimetrischer Analysen bestimmt. Die gemessenen spezifischen Oberflächen  $\sigma_A$  der gereinigten und getrockneten Mikrogele variierten mit der chemischen Zusammensetzung der Mikrogele. Poly(MAA)-co-(EGDMA)Mikrogele, die in einem molaren Verhältnis von 1:2 funktionales Monomer zu Vernetzer hergestellt wurden, resultierten in einem  $\sigma_A = 57,1$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> in Gegenwart des Templats und  $\sigma_A = 53,2$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> in Abwesenheit eines Templats. Bei Änderung des molaren Verhältnisses zu 1:4 veränderte sich die spezifische Oberfläche zu  $\sigma_A = 64,9$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Auch bei den aus MAA-DVB hergestellten Partikeln war die spezifische Oberfläche in Gegenwart eines Templats größer, und zwar betrug  $\sigma_A = 70,0$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> in Anwesenheit des Templats und  $\sigma_A = 61,3$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> ohne Templat.

#### Ausführungsbeispiel 7

##### Templatbindung

- In Anwesenheit von Templat synthetisierte Mikrogele wurden vor den Bindeexperimenten extrahiert. Die

Extraktionseffizienz kann durch Kalkulation wie folgt ermittelt werden: Aus der Zusammensetzung der Ausgangsmaterialien ist bekannt, dass in 400 mg Mikrogel maximal 83,9  $\mu\text{mol}$  BFA enthalten sein können, wobei mögliche Verluste des Templats während der Herstellung und Reinigung der Mikrogele nicht berücksichtigt werden. Der erste Extraktionsschritt entfernte bereits 49,3  $\mu\text{mol}$  BFA aus dem Mikrogel, was 59 % entspricht. Durch viermalige Wiederholung des Extraktionsschrittes konnten 64,5  $\mu\text{mol}$  BFA extrahiert werden, was 77 % entspricht. Mit D-BFA anstelle von L-BFA hergestellte Mikrogele erlauben eine Extraktion bis zu 72 %.

Für die Bindeexperimente mit Templaten wurden 400 mg gereinigten und getrockneten Mikrogels fünf Mal in 20 ml THF (Tetrahydrofuran) eine Stunde suspendiert, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Templatkonzentration im Überstand wurde mittels eines UV-Spectrometers (Spectramax Plus, Molecular Devices) gemessen. 50 mg extrahierten und getrockneten Mikrogels wurden in 5, 10 oder 20 ml einer Templatlösung in Methanol/Wasser (50:50, v/v) suspendiert bei einer BFA-Konzentration von 1 mM. Nach 20-stündiger Inkubation wurde die Suspension mittels Ultrazentrifugation (20.000 Upm, 35 Minuten) getrennt und die Menge an Templat im Überstand mittels UV-Spektroskopie quantifiziert.

Der Nachweis der spezifischen Rückbindung des BFA-Templats wurde titrimetrisch mittels UV-Spektroskopie durchgeführt. Dazu wurde ein mit L-BFA geprägtes Mikrogel aus Poly (MAA-co-EGDMA) mit einem Monomer/Vernetzer-Anteil von 1:4 vorgelegt

- und (a) L-beziehungsweise (b) D-BFA zutitriert. Als Referenz diente das analoge nicht geprägte Mikrogel (c). Figur 3 fasst die Titrationsexperimente zusammen. In Figur 3 ist eine quantitativ deutlich stärkere Rückbindung für das Prägemolekül L-BFA im Vergleich zum D-Enantiomer zu sehen, was einer spezifischen Bindung entspricht. Die geringe Bindung von L-BFA im Fall des nicht geprägten Mikrogels (c) ist auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen.
- 10 Die Beispiele zeigen, dass aus Poly(MAA)-co-(EGDMA), Poly(EGDMA), Poly(MAA)-co-(DVB) und Poly(DVB) Mikrogele mittels Miniemulsionspolymerisation synthetisiert werden können und in vorzüglicher Weise ein direktes nicht-kovalentes molekulares Prägen einer chiralgeschützten Aminosäure er-
- 15 lauben. Die besten molekularen Wiedererkennungseigenschaften wies Poly(MAA)-co-(EGDMA) auf, insbesondere in einem molaren Verhältnis von 1:4 der Monomere. Die vorliegende einschrittige Verfahrensweise eröffnet daher neuartige Anwendungsmöglichkeiten molekularen Prägens. Die entwickelte Miniemulsionspolymerisation zur Herstellung molekular geprägter Polymere weist sowohl hinsichtlich der Ausbeute von Nanopartikeln im Verhältnis zu den
- 20 Edukten als auch hinsichtlich der Rückgewinnung von Templaten hohe Effizienz auf, wobei die hergestellten Nanosphären beziehungsweise Nanopartikel eine große spezifische Oberfläche und kleine Gesamtgröße aufweisen. Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können zum Erkennen und Binden bestimmter Substanzen
- 25 in verdünnten Lösungen eingesetzt werden, zum Beispiel für das Abtrennen toxischer Agenzien. Katalytisch aktive Nanopartikel der Erfindung können in
- 30

Suspension eingesetzt werden und stellen so die Möglichkeit zur Verfügung, leicht zugängliche katalytische Stellen auf kolloidaler Oberfläche bereitzustellen. Erfindungsgemäße Mikrogele können zum Beschichten von Sensoroberflächen oder Membranen eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen Mikrogele und Nanopartikel erweisen sich als besonders vorteilhaft insofern, als dass sie in geometrisch nicht limitierter Weise aufgebracht werden können, zum Beispiel auf analytische oder medizinische Vorrichtungen in beliebiger Geometrie.

Einen weiteren Beweis für die spezifische Wiedererkennung leistet die isotherme Titrationsmikrokalorimetrie (ITC). Mit dieser kalorimetrischen Methode werden über definierte portionsweise Zugaben Reaktionspartner gemischt. Die dabei freiwerdenden Wärmen werden aufgezeichnet. Mit dieser Art der Durchführung der Experimente ist die direkte Bestimmung von Reaktionsenthalpien möglich. Die Reaktionsenthalpien geben Aufschluss über die Stärke einer Reaktion. Titriert man D- (Figur 4d) oder L-BFA-haltige Lösungen (Figur 4c) mit einem nicht geprägten Mikrogel erhält man Reaktionsenthalpien um  $\pm 0$  KJ/mol. Verwendet man im Gegensatz dazu ein L-BFA geprägtes Mikrogel und titiert damit L-beziehungsweise D-BFA, erhält man exotherme Reaktionsenthalpien. Bei dem Versuch mit L-BFA (Figur 4b) erhält man im Vergleich zu dem Versuch mit D-BFA (Figur 4a) eine um 57 % erhöhte Reaktionsenthalpie. Die Ergebnisse und die Versuchsparameter sind in der Figur 4 beziehungsweise in der Tabelle zusammengefasst.



## Tabelle

Dargestellt sind die Versuchsbedingungen (Reaktionspartner, Konzentrationsangaben) und die Ergebnisse (Reaktionsenthalpien) der mikrokalorimetrischen Untersuchungen an geprägten und nicht geprägten Mikrogelen.

Reaktionspartner	Zugabe Mikrogel (mg)	Konz. BFA $\mu\text{mol/l}$	Reaktionsenthalpie $\Delta H_R$ (KJ/mol)
L-BFA geprägtes Mikrogel/L-BFA (b)	20,5	770	$-21,1 \pm 0,7$
L-BFA geprägtes Mikrogel/D-BFA (a)	20,5	767	$-12,1 \pm 0,5$
nicht geprägtes Mikrogel/L-BFA (c)	20,5	770	$\approx 0$
nicht geprägtes Mikrogel/D-BFA (d)	20,5	767	$\approx 0$

- 41 -

Die Figur 4 zeigt die integrierte und normalisierten Isothermen der Titration von L-BFA geprägtem Mikrogel auf D-BFA (a) und L-BFA (b), sowie der Titration von nicht geprägtem Mikrogel auf L-BFA (c) beziehungsweise D-BFA (d).

Figur 5 zeigt die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren a) des reinen L-BFA, b) des L-BFA geprägten Mikrogels und c) des Mikrogels nach Extraktion des L-Templats. Sowohl die Bindung des Templats im geprägten Mikrogel als auch die Extraktion sind anhand der Intensität der NMR-Signale des L-BFA qualitativ eindeutig nachweisbar.

#### Ausführungsbeispiel 8

Herstellung von surfmerstabilisierten Latexpartikeln

50 mg des polymerisierbaren Emulgators p-(11-Acrylamido)-undecenoyloxyphenyl-dimethylsulfonium methylsulfat werden in 30 mL Wasser unter Rühren gelöst. Durch diese Lösung wird eine Stunde lang Argon geleitet. Daraufhin erfolgt unter Rühren die Zugabe von 1,8 mL Methylmethacrylat (MMA). Die entstandene Emulsion wird auf 60°C erwärmt. Durch Zugabe von 10 mg 2,2'-Azobis (2-Amidinopropan) dihydrochlorid wird die Copolymerisation von dem auch als Emulgator wirkenden p-(11-Acrylamido)-undecenoyloxyphenyl-dimethylsulfoniummethylsulfat und MMA gestartet. Nach 5 h wurde die Reaktion beendet, die Latexlösung abgekühlt und die Teilchengröße mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Der Mittelwert der Größenverteilung (bezogen auf die

- 42 -

Intensitätsverteilung) befindet sich zwischen 140 und 150 nm.

Das so erhaltene Polymer wird anschließend mit molekülspezifischen Erkennungsstellen versehen, zum  
5 Beispiel Streptavidin-Gruppen.

Zur Abtrennung von überschüssigen Monomeren und Initiatorresten wurde die Latexlösung dreimal zentrifugiert, der Überstand verworfen und die abzentrifugierten Polymerpartikel in Wasser redispergiert.  
10

20 µL der gereinigten Latexlösung wurden in 1 mL Phosphatpuffer (pH 7,8) aufgenommen und mit 10 µL Streptavidinlösung ( $C_{sav} = 13,4$  nmol/mL) versetzt. Die so hergestellte Reaktionslösung wurde 2 h bei  
15 Raumtemperatur geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Zur Abtrennung von nicht immobilisiertem Streptavidin wurde die Latexlösung dreimal zentrifugiert, der Überstand verworfen und die abzentrifugierten Polymerpartikel in Wasser redispergiert.  
20 1 µL der hergestellten Suspension wurde zusammen mit Sinapinsäurelösung auf einen MALDI-TOF-MS-Probenträger (Matrix Assisted Laserdesorption Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry) gebracht und analysiert. Im Massenspektrum der Probe (Figur  
25 6) ist bei einem m/z Verhältnis von 12979 Da/Elementarladung ein Signal vorhanden, welches dem Streptavidin  $[M+1]^+$ -Signal zugeordnet werden kann ( $6489$  Da =  $[M+1]^{2+}$ ).

Auf den Partikeln ist demnach Streptavidin durch  
30 das polymerisierbare Aktivester-Tensid gebunden.

Ansprüche

- 5 1. Molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisende Nanopartikel mit einem Durchmesser von 5 bis 1000 nm, erhältlich durch Herstellen einer Emulsion, umfassend zwei nicht miteinander mischbare Phasen, wobei die Emulsion
- 10 a) mindestens ein Monomer,
- b) mindestens ein Molekülspezifität verleihendes Agens,
- c) gegebenenfalls mindestens einen Initiator,
- d) gegebenenfalls mindestens einen Vernetzer und
- 15 e) mindestens einen Emulgator enthält
- und Durchführen einer Emulsionspolymerisation.
2. Nanopartikel nach Anspruch 1, erhältlich durch
- a) Herstellen eines Monomer-haltigen Gemisches aus mindestens einem Monomer, mindestens einem Molekülspezifität verleihenden Agens, gegebenenfalls
- 20 einem Initiator sowie gegebenenfalls einem Vernetzer,
- b) Herstellen einer Emulgator-haltigen Lösung und
- c) Durchführen einer Emulsionspolymerisation durch
- 25 Vereinigen der Emulgator-haltigen Lösung mit dem Monomer-haltigen Gemisch.

- 44 -

3. Nanopartikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Emulsionspolymerisation durch thermisches oder photochemisches Starten eingeleitet wird.
4. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Emulsion vor Beginn der Polymerisation ein stabilisierendes Mittel hinzugegeben wird.
5. Nanopartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Molekülspezifität verleihende Agens ein Templat ist.
6. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Monomer mindestens eine funktionelle Gruppe aufweist, die zur Interaktion mit einem Templat befähigt.
7. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Templat nach dem Emulsionspolymerisationsvorgang aus den gebildeten Nanopartikeln herausgelöst wird.
8. Nanopartikel nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Templat eine Aminosäure, Aminosäurederivat, Peptid, Protein, Antikörper, Glycoprotein, Cofaktor, Vitamin, Biotin, Enzym, Nucleinsäure, Bakterium, Virus, Viroid, Prion, Zellorganell- oder Bestandteil, Proteoglycan, Lipid, Lektin, Kohlenhydrat, Monosaccharid, Oligosaccharid, Polysaccharid, Glycosaccharid oder heterozyklische Verbindung ist.

- 45 -

9. Nanopartikel nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, wobei das die Molekülspezifität verleihende Agens ein oberflächenaktives polymerisierbares Monomer ist.
10. Nanopartikel nach Anspruch 9, wobei das ober-  
5 flächenaktive polymerisierbare Monomer amphiphil ist.
11. Nanopartikel nach Anspruch 10 oder 11, wobei das oberflächenaktive polymerisierbare Monomer molekülspezifische Erkennungsstellen trägt.
- 10 12. Nanopartikel nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei das oberflächenaktive polymerisierbare Monomer mittels mindestens einer chemischen Reaktion mit molekülspezifischen Erkennungsstellen versehen wird.
- 15 13. Nanopartikel nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei das oberflächenaktive polymerisierbare Monomer ein Vinyl-Monomer, zum Beispiel ein Methacryl-, Acryl-, Acrylamid-, Styrol-, Styrolsulfon-Monomer, mit hydrophoben Segmenten, umfassend zum Beispiel  
20 Methylen, Ethylenoxid oder Butylenoxid, und hydrophilen reaktiven Endgruppen, zum Beispiel einer Ether-, Ester-, Sulfonium-aktivierten Ester-, Sulfat-, Pyridinium-, Halogenalkylammonium- oder Succinimidester-Gruppe, ist, zum Beispiel ein Vi-  
25 nylalkyloxyloxyphenyldimethylsulfoniumsalz, Alkylpyridiniumbromidmaleinsäurediester, Bromalkylammoniummethacrylat oder Natriummethacryloylsulfat.
14. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Monomer ein  
30 hydrophiles Monomer ist.

- 46 -

15. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Monomer ein hydrophobes Monomer ist.
- 5 16. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das die Molekülspezifität verleihende Agens, insbesondere das Templat oder/und das oberflächenaktive polymerisierbare Monomer wasserlöslich oder wasserunlöslich ist.
- 10 17. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Vernetzer ein hydrophober oder hydrophiler Vernetzer ist.
- 15 18. Nanopartikel nach Anspruch 17, wobei der Vernetzer ein Acrylatderivat, zum Beispiel Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA), N,N'-Methylenbisacrylamid, Trimethylolpropantrimethacrylat oder Bisphenol A®, oder ein Styrolderivat, zum Beispiel Divinylbenzol oder Diallylweinsäurediamid ist.
- 20 19. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Initiator ein Azoderivat, zum Beispiel  $\alpha,\alpha'$ -Azoisobutyronitril, 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril oder 1,1'-Azodi(hexahydrobenzonitril, oder ein Peroxid, zum Beispiel Kaliumperoxodisulfat oder Bis( $\alpha$ - $\alpha$ -dimethylbenzyl)peroxid ist.
- 25 20. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Emulgator ein ionischer Emulgator, zum Beispiel Natriumdodecylsulfat oder Hexadecylsulfonsäure, ein kationischer Emulgator, zum Beispiel Hexadecyltrimethylammoniumbromid oder Dodecylpyridiniumchlorid oder ein nichtionischer E-

-47-

mulgator, zum Beispiel Brij 72®, Span 20® oder Tween 80®, ist.

21. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nanopartikel in Form von kolloidalen Polymeren, also Latices, insbesondere vernetzten Latices, also Microgelen, oder geträgert vorliegen.

22. Verfahren zur Herstellung molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisender Nanopartikel, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine zwei nicht miteinander mischbare Phasen umfassende Emulsion hergestellt wird, enthaltend

- a) mindestens ein Monomer,
- b) mindestens ein Molekülspezifität verleihendes Agens,
- c) gegebenenfalls mindestens einen Initiator,
- d) gegebenenfalls mindestens einen Vernetzer und
- e) mindestens einen Emulgator

und anschließend eine Emulsionspolymerisation durchgeführt wird.

23. Verfahren zur Herstellung molekülspezifische Erkennungsstellen aufweisender Nanopartikel nach Anspruch 22, wobei ein Monomer-haltiges Gemisch aus mindestens einem Monomer, mindestens einem Molekülspezifität verleihenden Agens, gegebenenfalls mindestens einem Initiator und gegebenenfalls mindestens einem Vernetzer sowie eine Emulgator-



haltige Lösung hergestellt werden, wobei das Monomer-haltige Gemisch und/oder die Emulgator-haltige Lösung mit einem stabilisierenden Mittel versetzt und wobei eine Emulsionspolymerisation durch Vereinigen der Emulgator-haltigen Lösung mit dem Monomer-haltigen Gemisch durchgeführt wird.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, wobei die Emulsionspolymerisation eine hydrophile-Phase-in-hydrophobe-Phase-Emulsionspolymerisation, wie Wasser-in-Öl- oder hydrophobe-Phase-in-hydrophile-Phase-Emulsionspolymerisation, wie eine Öl-in-Wasser-Emulsionspolymerisation ist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22, 23 oder 24, wobei die Emulsionspolymerisation eine Mikro- oder Miniemulsionspolymerisation ist.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, wobei das Molekülspezifität verleihende Agens ein Templat ist und dieses nach der Emulsionspolymerisation aus den gebildeten Nanopartikeln herausgelöst wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, wobei das Molekülspezifität verleihende Agens ein oberflächenaktives polymerisierbares Monomer, insbesondere ein amphiphiles Monomer ist.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, wobei die Emulsionspolymerisation thermisch oder photochemisch gestartet wird.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28, wobei das stabilisierende Mittel Hexadecan ist.

30. Partikulär aufgebauter Film oder partikulär aufgebaute Membran, hergestellt durch Abscheiden von Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 1 bis 20 aus Latices, insbesondere Mikrogelen gemäß Anspruch 21.

31. Film oder Membran nach Anspruch 30, wobei dieser eine Dicke von 10 nm bis 1000 µm, insbesondere 10 nm bis 500 µm aufweist.

32. Film oder Membran nach Anspruch 30 oder 31, der auf einem Substrat geträgert ist.

33. Film oder Membran nach einem der Ansprüche 30 bis 32, wobei der Träger vor der Beschichtung mit dem Film oder der Membran vorbehandelt wurde.

34. Film oder Membran nach einem der Ansprüche 30 bis 33, wobei das Substrat eine Sensoroberfläche, ein Stent, eine Filtermembran, ein Hohlfasermodule, ein Metall, ein Halbmetall wie Silizium, ein Metalloxid, Glas, Papier, ein Kunststoff wie Polyester, Polyarylsulfon, Polyethersulfon, Polyphenylsulfon, Polyvinylsulfon, Polystyrol, Polycarbonat, Polyethylen, Polypropylen, Polyacetylen, Polyvinylpyridin und Derivate, Polyvinylidenfluorid, Polyvinylchlorid, Polyvinylpyrrolidon, Polytetrafluorethylen und Derivate, Nylon, Polyphenyloxid, verflechtene oder verfilzte Fasern, mikroporöse Keramiken, Graphit, rostfreier Stahl, eine Membran, ein Filter, eine Folie oder ähnliches ist.

35. Film oder Membran nach einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei der Film oder die Membran mechanisch

- 50 -

stabil und/oder permeabel und/oder regenerierbar sind.

36. Verfahren zur Herstellung eines Films oder einer Membran nach einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei  
5 bei mindestens ein Latex nach Anspruch 21 mindestens einer Filtration sowie einer Trocknung ausgesetzt und ein partikulärer ein- oder mehrschichtiger Film oder Membran erhalten wird.

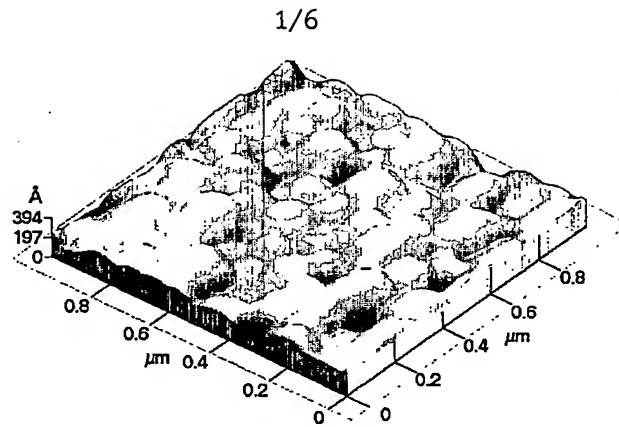


Fig. 1

2/6

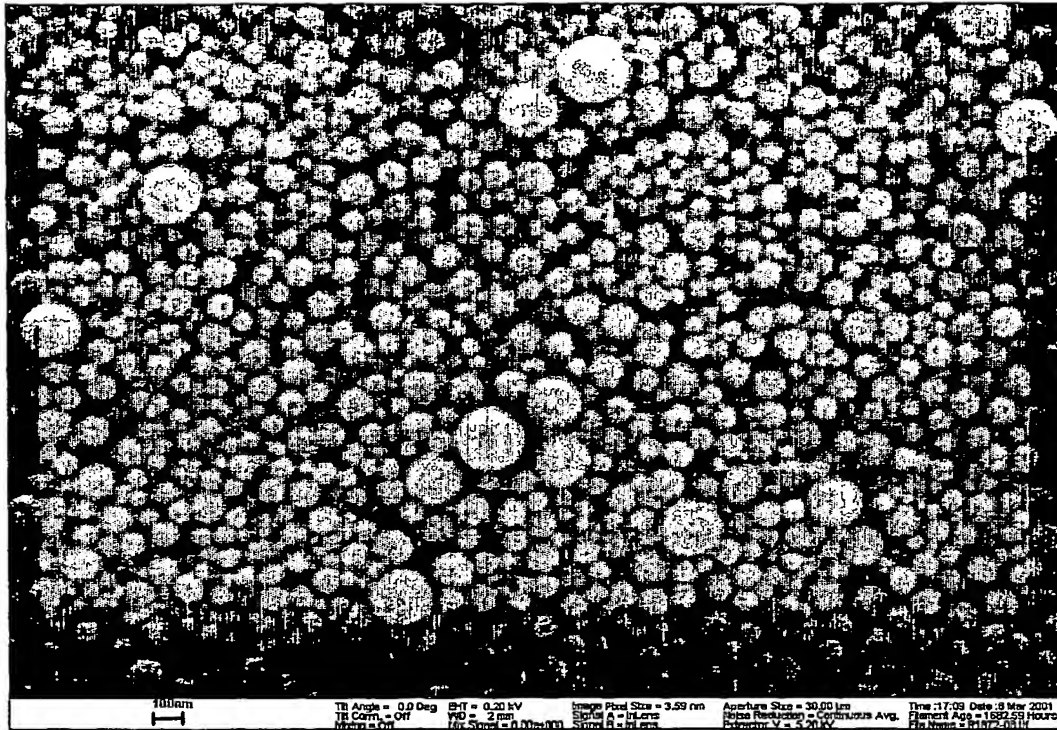


Fig. 2

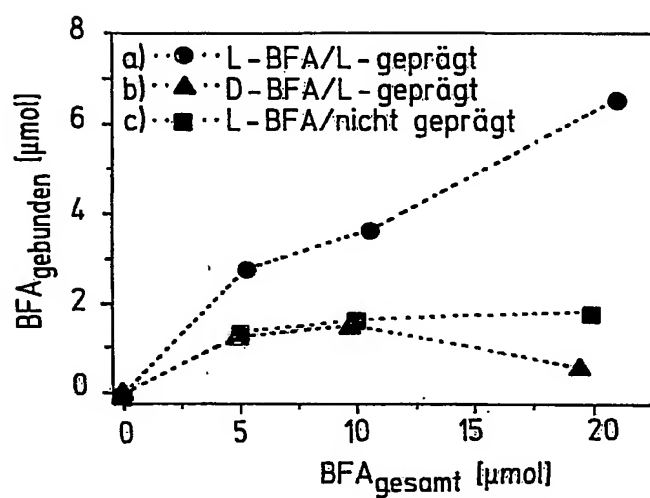


Fig.3

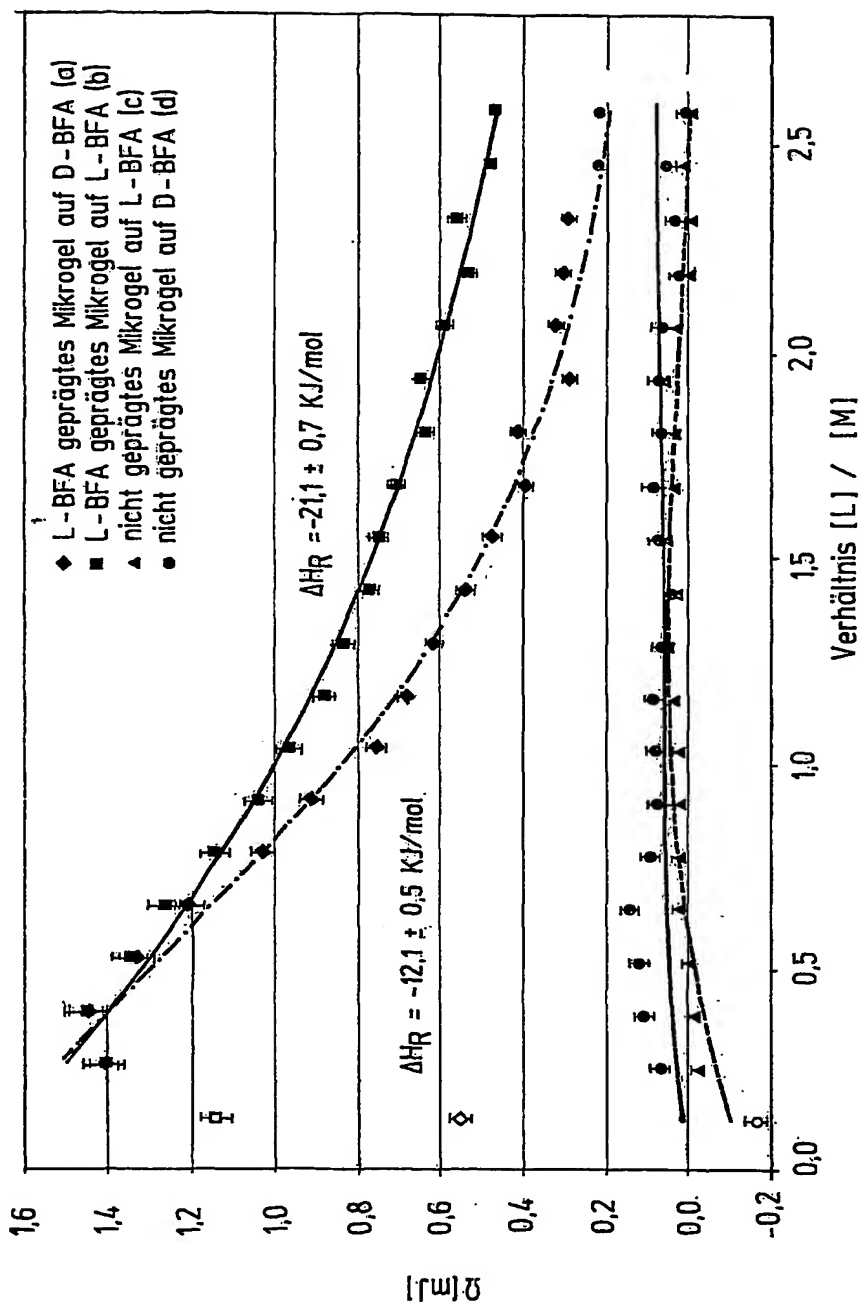


Fig.4

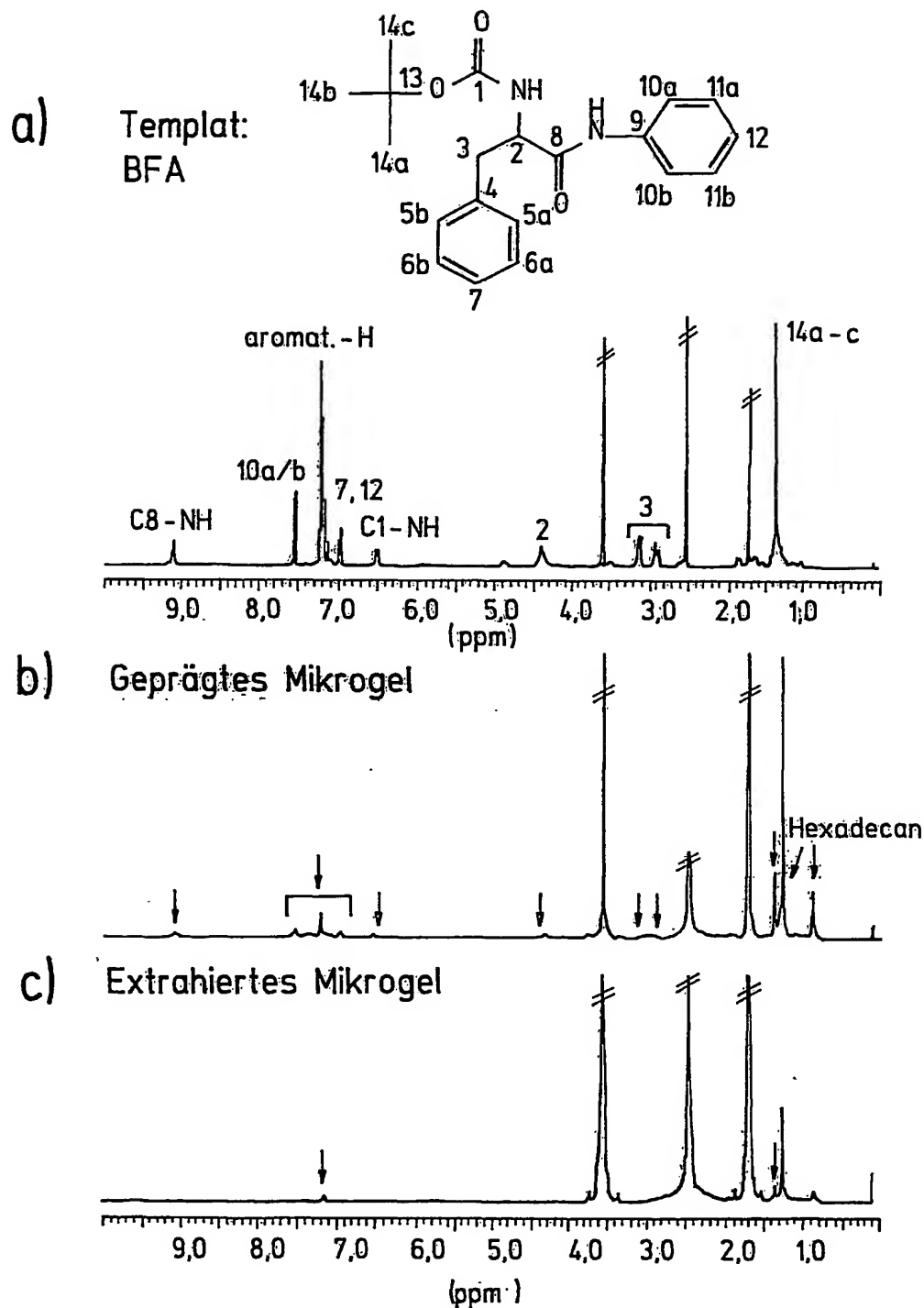


Fig.5.



6 / 6

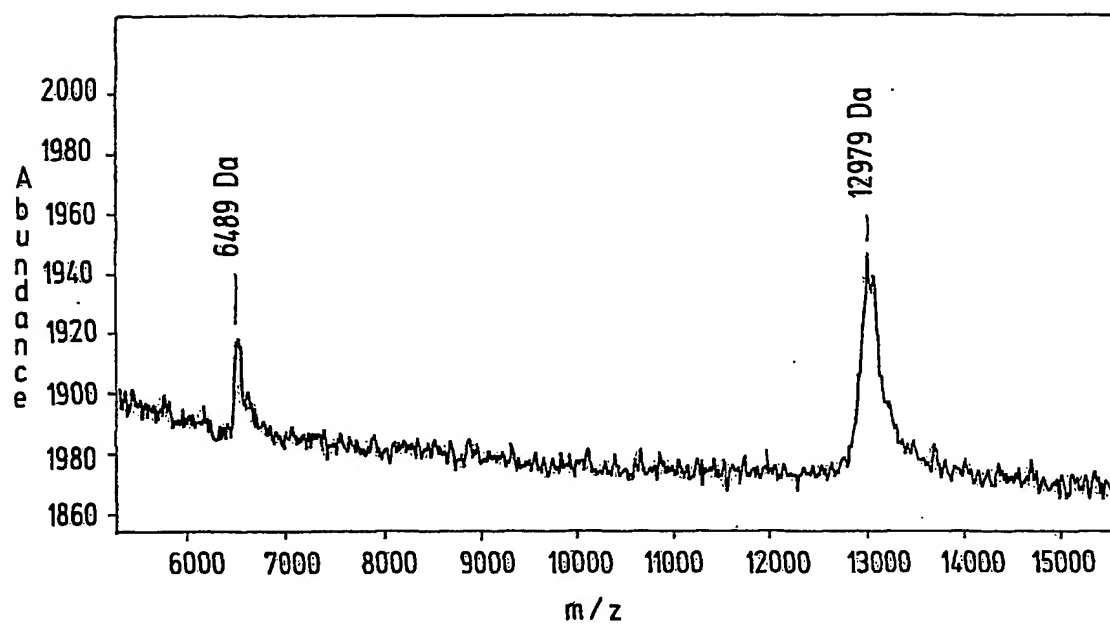


Fig.6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

EP 01/07525

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08F2/24 G01N33/545 C08F2/44 C07B57/00 B01D69/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08F G01N C07B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 021 364 A (SPEISER PETER ET AL) 3 May 1977 (1977-05-03) cited in the application the whole document	1-8, 14-25, 28, 29
X	MARIA J. UNZUÉ, ET.A.: "Reactive Surfactants in heterophase Polymerization." J. APPLIED POLYMER SCIENCE, vol. 66, 1997, pages 1803-1820, XP002180422 cited in the application the whole document	1-4, 9-25, 27-32

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2001

Date of mailing of the international search report

08/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pollio, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

EP 01/07525

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	NATALIA PEREZ, MICHAEL J. WHITCOMBE, EVGENY N. VULSON: "Surface imprinting of cholesterol on submicrometer core-shell emulsion particles." MACROMOLECULES, vol. 34, 2001, pages 830-836, XP002180423 the whole document ---	1-4, 9-25, 27-32
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 200056 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A89, AN 2000-593239 XP002181559 & SE 9 802 911 A (HAUPT K), 29 February 2000 (2000-02-29) abstract ---	30-36
Y	WO 95 03878 A (DOW CHEMICAL CO ;RIES PAUL D (US); MCDONALD CHARLES J (US)) 9 February 1995 (1995-02-09) cited in the application the whole document ---	30-36
A	CRESCENZI V ET AL: "MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS BINDING CLENBUTEROL", POLYMER PREPRINTS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, VOL. 39, NR. 2, PAGE(S) 699-700 XP001031556 ISSN: 0032-3934 the whole document ---	1-36
A	US 5 959 050 A (MOSBACH KLAUS ET AL) 28 September 1999 (1999-09-28) cited in the application the whole document -----	1-36

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 01/07525

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4021364	A	03-05-1977	CH 594444 A5	13-01-1978
			AR 199710 A1	23-09-1974
			AU 6297773 A	29-05-1975
			BE 808034 A1	15-03-1974
			DD 110181 A5	12-12-1974
			DE 2360384 A1	12-06-1974
			ES 420930 A1	01-04-1976
			FR 2208716 A1	28-06-1974
			GB 1436355 A	19-05-1976
			JP 49086525 A	19-08-1974
			NL 7316576 A	06-06-1974
			SU 529804 A3	25-09-1976
			ZA 7309171 A	27-11-1974
SE 9802911	A	29-02-2000	NONE	
WO 9503878	A	09-02-1995	AU 679257 B2	26-06-1997
			AU 7477894 A	28-02-1995
			DE 69417238 D1	22-04-1999
			DE 69417238 T2	08-07-1999
			DK 711199 T3	05-06-2000
			EP 0711199 A1	15-05-1996
			ES 2128576 T3	16-05-1999
			JP 9503155 T	31-03-1997
			WO 9503878 A1	09-02-1995
US 5959050	A	28-09-1999	AU 5859796 A	11-12-1996
			EP 0828767 A1	18-03-1998
			JP 11507402 T	29-06-1999
			WO 9637527 A1	28-11-1996
			US 5821311 A	13-10-1998
			US 5872198 A	16-02-1999

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
EP 01/07525

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C08F2/24 G01N33/545 C08F2/44 C07B57/00 B01D69/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08F G01N C07B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 021 364 A (SPEISER PETER ET AL) 3. Mai 1977 (1977-05-03) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-8, 14-25, 28,29
X	MARIA J. UNZUÉ, ET.A.: "Reactive Surfactants in heterophase Polymerization." J. APPLIED POLYMER SCIENCE, Bd. 66, 1997, Seiten 1803-1820, XP002180422 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-4, 9-25, 27-32

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Oktober 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/11/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pollio, M

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07525

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
P,X	NATALIA PEREZ, MICHAEL J. WHITCOMBE, EVGENY N. VULSON: "Surface imprinting of cholesterol on submicrometer core-shell emulsion particles." MACROMOLECULES, Bd. 34, 2001, Seiten 830-836, XP002180423 das ganze Dokument ----	1-4, 9-25, 27-32
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 200056 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A89, AN 2000-593239 XP002181559 & SE 9 802 911 A (HAUPT K), 29. Februar 2000 (2000-02-29) Zusammenfassung ----	30-36
Y	WO 95 03878 A (DOW CHEMICAL CO ;RIES PAUL D (US); MCDONALD CHARLES J (US)) 9. Februar 1995 (1995-02-09) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	30-36
A	CRESCENZI V ET AL: "MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS BINDING CLENBUTEROL" , POLYMER PREPRINTS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, VOL. 39, NR. 2, PAGE(S) 699-700 XP001031556 ISSN: 0032-3934 das ganze Dokument ----	1-36
A	US 5 959 050 A (MOSBACH KLAUS ET AL) 28. September 1999 (1999-09-28) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-36

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

EP 01/07525

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4021364 A	03-05-1977	CH 594444 A5 AR 199710 A1 AU 6297773 A BE 808034 A1 DD 110181 A5 DE 2360384 A1 ES 420930 A1 FR 2208716 A1 GB 1436355 A JP 49086525 A NL 7316576 A SU 529804 A3 ZA 7309171 A	13-01-1978 23-09-1974 29-05-1975 15-03-1974 12-12-1974 12-06-1974 01-04-1976 28-06-1974 19-05-1976 19-08-1974 06-06-1974 25-09-1976 27-11-1974
SE 9802911 A	29-02-2000	KEINE	
WO 9503878 A	09-02-1995	AU 679257 B2 AU 7477894 A DE 69417238 D1 DE 69417238 T2 DK 711199 T3 EP 0711199 A1 ES 2128576 T3 JP 9503155 T WO 9503878 A1	26-06-1997 28-02-1995 22-04-1999 08-07-1999 05-06-2000 15-05-1996 16-05-1999 31-03-1997 09-02-1995
US 5959050 A	28-09-1999	AU 5859796 A EP 0828767 A1 JP 11507402 T WO 9637527 A1 US 5821311 A US 5872198 A	11-12-1996 18-03-1998 29-06-1999 28-11-1996 13-10-1998 16-02-1999